Микробиология и вирусология

ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

Профессор М. С. ДУНИН,
доктор сельскохозяйственных наук
(Кафедра фитопатологии)
Старший научный сотрудник А. Д. ВОЛОДАРСКИЙ
(Иммунологическая лаборатория Станции защиты растений ТСХА)

УДК 632.3

Получившее за последние годы широкое развитие биофизики и биохимии, а также создание новой лабораторной техники вооружили исследователей более совершенными и тонкими методами исследований, позволяющими глубже познать существо процессов, происходящих в больном растении. Однако биофизические и биохимические методы исследований еще не нашли достаточного применения в фитопатологии.

В Постановлении ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по дальнейшему развитию биологической науки и укреплению ее связи с практикой (9 января 1963 г.)» одной из задач указано усиление взаимодействия между биологией и такими разделами естествознания, как физика и химия. Дальнейшее успешное развитие фитопатологических исследований немыслимо, если они не будут опираться на новые технические возможности, предоставляемые фитопатологу биофизикой и биохимией.

Отметив все возрастающее значение таких наук, как биохимия, биофизика, микробиология, вирусология и иммунология, ЦК КПСС и Совет Министров СССР определили, что в числе основных проблем биологической науки в области сельского хозяйства особенно большое значение имеют:

«...создание новых препаратов и средств борьбы с болезнями и вредителями сельскохозяйственных растений;

...изыскание способов предохранения и ранней диагностики вирусных заболеваний и мер борьбы с ними в животноводстве и растениеводстве;

...изучение закономерностей в распределении и развитии возбудителей и переносчиков заболеваний и разработка эффективных путей их ликвидации».

Для решения задач, поставленных ЦК КПСС и Советом Министров СССР, в Тимирязевской академии при станции защиты растений организована Иммунологическая лаборатория для разработки более совершенных методов диагностики заболеваний растений.

Точная, быстрая и технически удобная диагностика фитопатоген-

ных вирусов, бактерий и вызываемых ими болезней растений имеет разностороннее и большое научно-познавательное значение. Она необходима для выяснения районов или зон распространения (ареалов) многочисленных вирозов и бактериозов культурных и дикорастущих растений, видового состава возбудителей этих заболеваний, очагов и условий сохранения (например, перезимовки) и способов распространения различных видов вирусной и бактериальной инфекции, видового состава поражаемых растений, изучения их иммунитета и т. д. Столь же существенное и даже еще большее значение имеют методы диагностики вирусных и бактериальных болезней растений для решения многих практических задач. Такие методы необходимы для оздоровления посадочного материала картофеля и рассадных культур, отбора здоровых привоев черенков и отводков в плодоводстве и виноградарстве, оценки поражаемости и отбора наиболее устойчивых к вирозам и бактериозам исходных (родительских) форм, промежуточных продуктов гибридизации и отселектированных сортообразцов растений при выведении болезнеустойчивых видов и сортов полевых, плодово-ягодных, овощных, декоративных, кормовых и других культур.

Усовершенствование методов диагностики вирусных и бактериальных болезней растений представляет особенно актуальную задачу еще и потому, что бактерии трудно, а очень часто совсем нельзя распознать по морфологическим признакам, широко используемым для диагностики болезней, вызываемых грибами, нематодами, тлями, клещиками и другими паразитами. На поверхности и внутри растений (на срезах) эти паразиты хорошо видны не только при микроскопическом, но зачастую и при макроскопическом осмотре анализируемых образцов. Поэтому уже давно назрела необходимость изучить и использовать физиолого-биохимические (в том числе тинкториальные) свойства фитопатогенных бактерий. Так, с течением времени были разработаны и введены в микробиологическую практику унифицированные наборы питательных сред. На них, как известно, выращиваются чистые культуры изучаемых микробов и определяются их виды по способности продуцировать кислоты или подщелачивать среду, разжижать желатину, продуцировать газ, ассимилировать исключительно или преимущественно те или иные источники азота, те или иные углеводы и т. д. Выявление этих и других культуральных свойств микробов, представляя трудоемкую и громоздкую работу, связано с большими затратами времени на каждый анализ.

Еще затруднительнее диагностика фитопатогенных вирусов. Из причин этих затруднений наиболее важны, пожалуй, очень широко распространенные явления патологической конвергенции (совпадения, сходства) симптомов, вызываемых различными вирусами у одного и того же вида или сорта растений. К тому же во множестве случаев те или иные симптомы, вызываемые у растений вирусами, неотличимы по внешнему виду от признаков болезней, обусловленных абиотическими факторами (нарушение режима минерального питания, светового режима и т. п.). Известно также, что один и тот же вирус вызывает подчас резко различные симптомы при заражении им различных растений: у одних болезнь проявляется в виде мозаики на листьях, у других растений тот же вирус может вызвать диффузный хлороз, некрозы (отмирание) отдельных участков листовой пластинки и т. д. Наконец, даже у растений одного и того же вида один и тот же вирус сплошь и рядом вызывает резко различные симптомы или скрытое (бессимптомное) течение болезни в зависимости от возраста или условий произрастания данного растения.

При всем этом диагностика фитопатогенных вирусов особенно осложняется еще и тем, что к ним нельзя применить даже громоздкое изучение их «культуральных свойств», подобно тому как это практи-

куется по отношению к микробам. Вирусы в силу их облигатно-паразитических свойств, как известно, нельзя культивировать на какой-либо мертвой питательной среде. В обход этого затруднения для диагностики фитопатогенных вирусов разработаны и применяются своеобразные дифференцирующие живые питательные среды в виде более или менее унифицированных наборов растений-дифференциаторов. У таких растений при заражении определенным вирусом появляются характерные комплексы симптомов, обусловленных реакцией растения на внедрение и размножение вирусной инфекции. Но даже специально подобранные растения-дифференциаторы далеко не при всяких условиях отзываются на заражение одним и тем же вирусом типичными симптомами. К тому же в рамках вируса одного вида существуют его штаммы, подчас резко различающиеся по симптомам, вызываемым ими у растений одного и того же вида.

Но так как многие вирусы могут распространяться и передаваться от одного поколения растений другому поколению через семена и особенно часто — при вегетативном размножении — через посадочный, прививочный и т. п. материал, то своевременное точное обнаружение и распознавание явной (а зачастую латентной, т. е. скрытой, бессимптомной) вирусной инфекции является решающе важным условием отбора и производственного использования здорового посадочного материала. Немалое профилактическое значение имеет и уничтожение зараженного материала (например, в карантинных питомниках) в целях защиты от распространения инфекции насекомыми и другими путями и способами. Именно этими мотивами обусловлено все возрастающее внимание к усовершенствованию методов диагностики вирусных и бактериальных болезней растений во всех странах мира. Об этом свидетельствуют международные мероприятия, осуществленные в последние годы. В системе учреждений ООН специальная Европейская и Средиземноморская Организация по защите растений от болезней и вредителей (ЕОЗР) в продолжение последних лет ведет большую и разностороннюю работу в этом направлении. По инициативе этой организации Международная научная конференция (Париж, 15—16 ноября 1960 г.) обсудила и унифицировала методы диагностики бактериальных болезней картофеля [13, 15 и др.].

Аналогичная (но более широкая по составу участников) конференция состоялась в Ганновере (октябрь 1962 г.) по проблеме диагностики вирусных болезней картофеля, а в июне 1963 г. по почину той же организации (ЕОЗР) была проведена работа двух международных комиссий экспертов; в этих комиссиях были представлены Англия, Голландия, Польша, СССР, ФРГ, Франция и Швеция. Задачей одной из этих комиссий было уточнить и унифицировать методы диагностики вирусов при помощи растений-индикаторов, а в задачу другой комиссии входило обсудить и унифицировать основные методические нормативы серологического анализа по отношению к наиболее распространенным вирусам, патогенным для картофеля.

Серодиагностика фитопатогенных вирусов и бактерий, как известно, основана на изучении и использовании их антигенных свойств, т. е. способности при парэнтеральном введении в организм животных (чаще всего кроликов и лошадей) вызывать накопление в крови этих животных особой фракции глобуликов (солерастворимых белков), известных под названием антител. Важнейшим их свойством, определяющим бесконечно разнообразное применение серологического анализа в медицине, ветеринарии, фитопатологии, энтомологии, генетике, селекции, семеноводстве и многих других отраслях науки и практики, является способность вступать в специфические реакции с теми антигенами (микробы, вирусы, белки

и др.), которые впрыскивались животным и вызывали накопление этих антител.

В СССР впервые был разработан очень простой и повсеместно доступный капельный метод Дунина — Поповой для серодиагностики вирусов [1]. Этот метод во многих странах получил, особенно в послевоенные годы, широкое применение в своем первоначальном виде и в нескольких модификациях в виде микрокапельных реакций по Ван-Слогтерену [16] (Голландия), Камеразу и Щербаковой [3] (СССР), Свижинскому [17] (Польская Народная Республика), Берксу [10] (ФРГ) и др. В предвоенный период (1941 г.) нами был разработан вискозиметрический метод, имеющий некоторые существенные преимущества перед капельным в отношении точности и количественной объективной оценки интенсивности реакций, но требующий применения бикапиллярного вискозиметра специальной конструкции [2].

Капельный и другие методы серодиагностики позволяют не только быстро обнаруживать вирусную инфекцию в растениях, но и осуществлять дифференциальную диагностику многих фитопатогенных вирусов и бактерий. Этим методам свойственна также высокая чувствительность, приближающаяся к чувствительности спектрального анализа. Однако чувствительность и точность серодиагностики отнюдь не беспредельны, и это, конечно, ограничивает возможности и область применения серологического анализа. К тому же для всех прежних модификаций серодиагностики фитопатогенных вирусов и бактерий характерна следующая общая черта. Реакции преципитации или агглютинации в пробирках, на поверхности стекла, на гидрофобных покрытиях и в тому подобных условиях, а также реакции, учитываемые вискозиметром, осуществляются в водных коллоидных растворах (в золях), в суспензиях, в агаризированных средах (реже в гелях иного типа). Между тем во множестве случаев очень важно все преимущества серодиагностики в отношении быстроты, точности и чувствительности реакций использовать при анализе не жидкостей, а таких, например, объектов, как поверхность срезов или глубже лежащие клетки и ткани исследуемых растений, распознавать один или несколько видов бактерий в их искусственной смеси или в естественном сообществе в больном клубне, в корнеплоде, луковице, плоде, листе, стебле и т. д.

Возможность такой серодиагностики почти вдвое расширила бы область применения диагностических антивозбудительных сывороток в научно-исследовательских и производственных работах по фитопатологической экспертизе и апробации растений и растительных материалов в системе учреждений по карантину растений, контрольно-семенных станций, сортоиспытательных пунктов, селекционно-семеноводческих учреждений и хозяйств, научно-исследовательских институтов, опытных станций, а также в учебной работе высших и средних сельскохозяйственных учреждений, университетов и т. д.

Не менее актуальны и аналогичные вирусологические задачи: выяснение локализации концентрации вирусов в различных органах, тканях, в различных клетках и в различных частях клеток зараженного растения, перемещение вирусов в растении, в насекомом-переносчике и др.

В настоящее время такая возможность стала реальной. По отношению к фитопатогенным вирусам и бактериям она осуществляется в результате получения л ю м и н е с ц и р у ю щ и х (светящихся) д и а г н о с т и ч е с к и х с ы в о р о т о к. Существо дела можно пояснить, сравнивая иммунные антитела таких сывороток с трассирующим и к тому же самонаводящимся снарядом. Такой снаряд, как известно, светится в полете и поэтому хорошо виден даже издали. Вместе с тем самонаводящийся снаряд «сам находит свою цель». Если, например, в водную суспензию, содержащую бактерии определенного вида, добавить неко-

торое количество сыворотки, содержащей антитела, специфические к этому виду микробов, то антитела подобно самонаводящимся снарядам «найдут» соответствующие «цели», т. е. бактериальные клетки, и вступят с ними в реакцию, образуя иммунологический комплекс антиген (т. е. бактерия) + антитела. Но при обычной серологической реакции (в данном случае — агглютинации) эти первичные комплексы вследствие своих малых размеров невидимы. Однако их можно обнаружить после того, когда такие комплексы, соединившись, образуют крупные скопления, хорошо видимые даже невооруженным глазом.

Представим себе, что к каждому антителу, содержащемуся в сыворотке, будет «привинчена» ультрамикроскопическая лампочка. Такие антитела будут обладать свойствами не только самонаводящегося, но и светящегося снаряда. По их свечению можно не только обнаружить соответствующие антигены (бактерии, вирусные частицы, частицы определяемого белка и т. п.), но и местоположение и концентрацию этих частиц в исследуемых органах, тканях и клетках растения, на его срезе, на отпечатке, сделанном на стекле, обнаружить искомый вид бактерии в сложной смеси и с другими бактериями, грибами и тому подобными объектами.

В качестве такой ультрамикроскопической «лампочки», прикрепляемой к антителам в антивозбудительной диагностической сыворотке, принципиально возможно использовать некоторые люминофоры, т. е. вещества, люминесцирующие под воздействием ультрафиолетовых лучей. Такая возможность первоначально была обоснована работами Кунса [11]. В дальнейшем эта проблема стала объектом многочисленных работ, выполненных отечественными и зарубежными исследователями, главным образом в области медицины [4, 5, 6, 7 и др.], и в меньшем объеме по отношению к возбудителям инфекционных болезней животных. В фитопатологии, насколько нам известно из отечественной литературы, люминесцентно-серологический метод не применялся.

Из зарубежной литературы нам известна лишь вирусологическая работа А. Нагарай и Л. Блек [14].

В настоящее время люминесцирующие сыворотки приготовляются и используются следующими тремя способами:

1) прямым методом Кунса и Каплана [12]. Он заключается в связывании антигена люминесцирующими антителами гомологичной сыворотки;

2) непрямым методом Уиллера и Кунса [18]; он состоит в обработке антигена немеченой диагностической сывороткой с последующим выявлением этого комплекса люминесцирующей сывороткой. Последнюю получают следующим образом: нормальной сывороткой (от того же животного, что и диагностическая) иммунизируют животное другого вида; полученную таким путем антисыворотку метят флуорохромом;

3) модифицированным вторым способом с введением в реакцию комплемента, который дает возможность выявить комплекс антиген + антитело + комплемент при помощи меченой антикомплементарной сыворотки.

Эти варианты употребляются в зависимости от применяемого типа серологических реакций. В фитопатологии и растениеводстве для выявления вирусных, бактериальных, грибных и тому подобных антигенов самыми распространенными типами серологического анализа являются реакции преципитации и агглютинации. В связи с этим нами был использован первый вариант (прямой метод).

В фитопатологии люминесцентный анализ применяется главным образом при карантинной экспертизе, где используется собственное свечение (аутофлуоресценция) или же разница между свечением жи-

вых и мертвых организмов или тканей, окрашенных соответствующим красителем. Однако такая диагностика заболеваний растений, как правило, не отличается необходимой точностью. При этом одним из главных источников диагностических ошибок является недостаточная специфичность аутофлуоресценции [4]. В этом отношении люминесцентно-серологические реакции принципиально отличаются тем, что в основе их лежат по самой их природе строго специфические реакции между антигенами и соответствующими им иммунными антителами.

Высокая чувствительность, точность и простота применения люминесцирующих антител побудили нас поставить серию опытов[1] с целью выяснить возможности использования люминесцентно-серологического метода для выявления и диагностики фитопатогенных вирусов и бактерий. Изучение вопроса было проведено на примере диагностических антивирусных и антибактериальных сывороток.

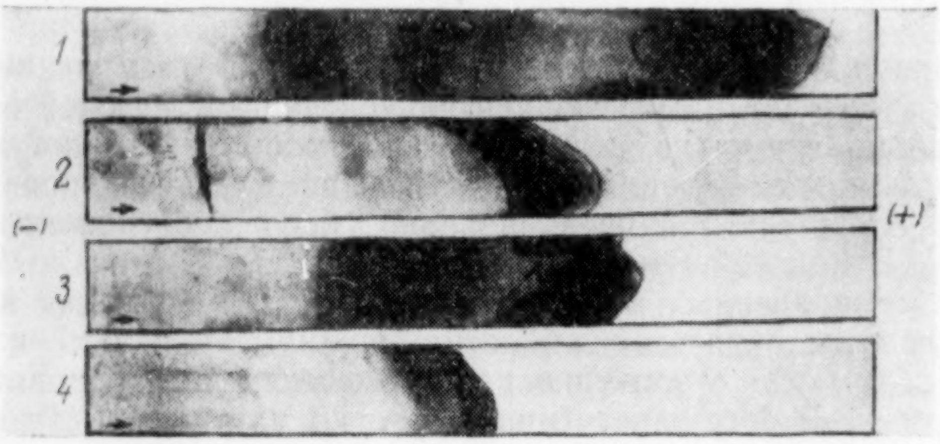


Рис. 1. Электрофореграммы белковых фракций антибактериальных сывороток:
1 — нативная сыворотка, специфичная к E. aroideae (фракции глобулиновые и альбуминовая); *2* — надосадочная жидкость нативной сыворотки, специфичной к E. aroideae после осаждения γ-глобулиновой фракции; *3* — нативная сыворотка, специфичная к C. sepedonicum (фракции глобулиновые и альбуминовая); 4 — надосадочная жидкость нативной сыворотки, специфичной к C. sepedonicum после осаждения γ-глобулиновой фракции.

Антивозбудительные сыворотки получены в нашей лаборатории иммунизацией кроликов фитопатогенными вирусами и бактериями: вирусом X картофеля, вирусом табачной мозаики (ВТМ) бактериями Erwinia arodea Towns. и Corynebacterium sepedonicum (Spieck. et Cotth.) Scapt. et Burkh. Диагностические сыворотки имели следующие титры: специфичная к вирусу X картофеля — 1 : 1024, специфичная к ВТМ — 1 : 124, к E. aroideae — 1 : 124, к C. sepedonicum — 1 : 64.

Для получения люминесцирующих сывороток использовали γ-глобулиновые фракции перечисленных выше нативных сывороток. Выделение γ-глобулиновой фракции для последующей метки ее флюорохромом проводили, чтобы удалить балластные белки альбуминовой и α-, β-глобулиновых фракций, содержащих очень незначительное количе-

[1] Первая часть работы по приготовлению люминесцирующих сывороток проведена в лабораториях Всесоюзного научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени академика Н. Ф. Гамалея. Пользуемся случаем высказать нашу большую признательность проф. А. А. Авакяну, проф. В. А. Благовещенскому, ст. научному сотруднику М. К. Корну и научному сотруднику М. Н. Астрахан за ценные советы и содействие.

ство иммунных антител. Гамма-глобулиновую фракцию по каждой сыворотке осаждали из нативной сыворотки насыщенным раствором сернокислого аммония. Осадок γ-глобулинов дважды промывали полунасыщенным раствором сернокислого аммония до белого цвета. После этого осадок γ-глобулинов растворяли в минимальном количестве (не более 10 мл) свежедистиллированной воды. Параллельно с этим электрофоретически проверяли чистоту белковых фракций, получаемых в процессе всех операций по выделению γ-глобулиновой фракции (рис. 1 и 2).

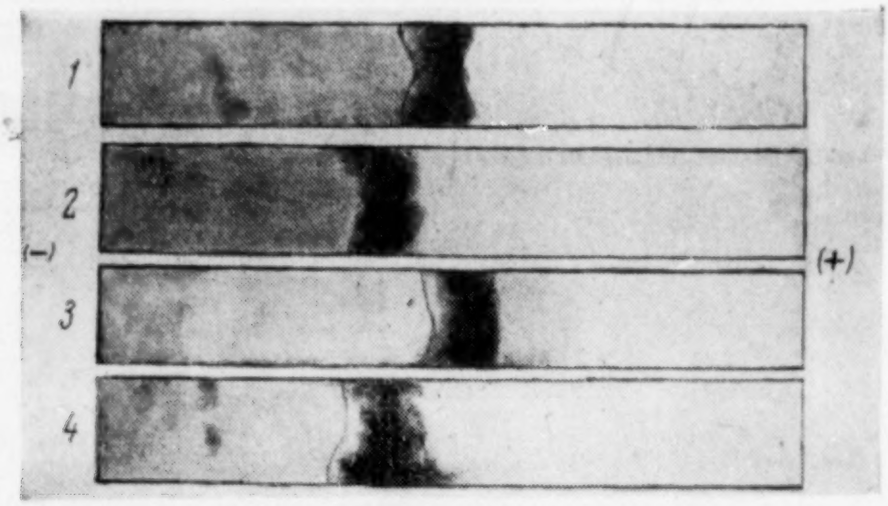


Рис. 2. Электрофореграммы, показывающие чистоту γ-глобулиновых фракций на различных этапах их метки изотиоцианатом флуоресцеина:
1 — конъюгат γ-глобулинов, специфичных к C. sepedonicum до диализа; *2* — γ-глобулины, специфичные к C. sepedonicum, отдиализированные; *3* — конъюгат γ-глобулинов, специфичных к ВТМ до диализа; *4* — γ-глобулины, специфичные к ВТМ, отдиализированные.

Растворенную в воде γ-глобулиновую фракцию ставили в целлофановом мешочке на диализ против физиологического карбонатно-бикарбонатного буфера. Диализ — подвижный при двукратной смене буфера в течение 7 дней, температура — не выше 4°. К раствору глобулинов в качестве консерванта добавляли мертиолат. На содержание сернокислого аммония диализационную жидкость проверяли реактивом Несслера. Для оценки качества γ-глобулиновой фракции после диализа определяли ее серологические свойства капельным методом Дунина-Поповой и чистоту — при помощи электрофореза на бумаге (рис. 2).

После диализа титр γ-глобулиновых фракций снижался по сравнению с титром нативных сывороток. Так, у γ-глобулинов, специфичных к вирусу X картофеля, титр стал 1 : 1000, у ВТМ — 1 : 16, у E. aroideae — 1 : 64, у C. sepedonicum — 1 : 4. Очевидно, это снижение произошло вследствие удаления вместе с балластными белками и некоторого количества специфичных антител. Авидитет глобулиновых фракций по сравнению с нативными сыворотками значительно повысился. Концентрацию белка для расчета красителя определяли двумя методами — по Кьельдалю — Конвею и по Лоури — Фолину электрофотометрически.

Глобулины с известной концентрацией белка подвергали конъюгированию с изотиоцианатом флуоресцеина марки ИРЕА-7 из расчета 5 мг красителя на 100 мг белка. Краситель предварительно растворяли в 3%-ном бикарбонатном буфере и добавляли к глобулинам медленно, по каплям, примерно по 5 мл в час при непрерывном помешивании на магнитной мешалке. Продолжительность взаимодействия белка и флюорохрома — 18 часов при температуре +4° и непрерывном помешивании. Затем маркированный белок в мешочке из целлофана ставили на подвижный диализ против физиологического карбонатно-бикарбонат-

ного буфера с pH 8,6—9 для удаления несвязавшегося с белком красителя. Диализ продолжался 7—8 суток. Полноту его определяли по отсутствию флуоресценции диализационной жидкости. После конъюгации еще раз проверяли чистоту меченых γ-глобулинов, затем еще раз проверяли освобождение их от несвязавшегося красителя при помощи электрофореза на бумаге (рис. 3). После проверки качества люминесцирующих сывороток разливали их по 0,5 см³ в ампулы и подвергали лиофильному высушиванию.

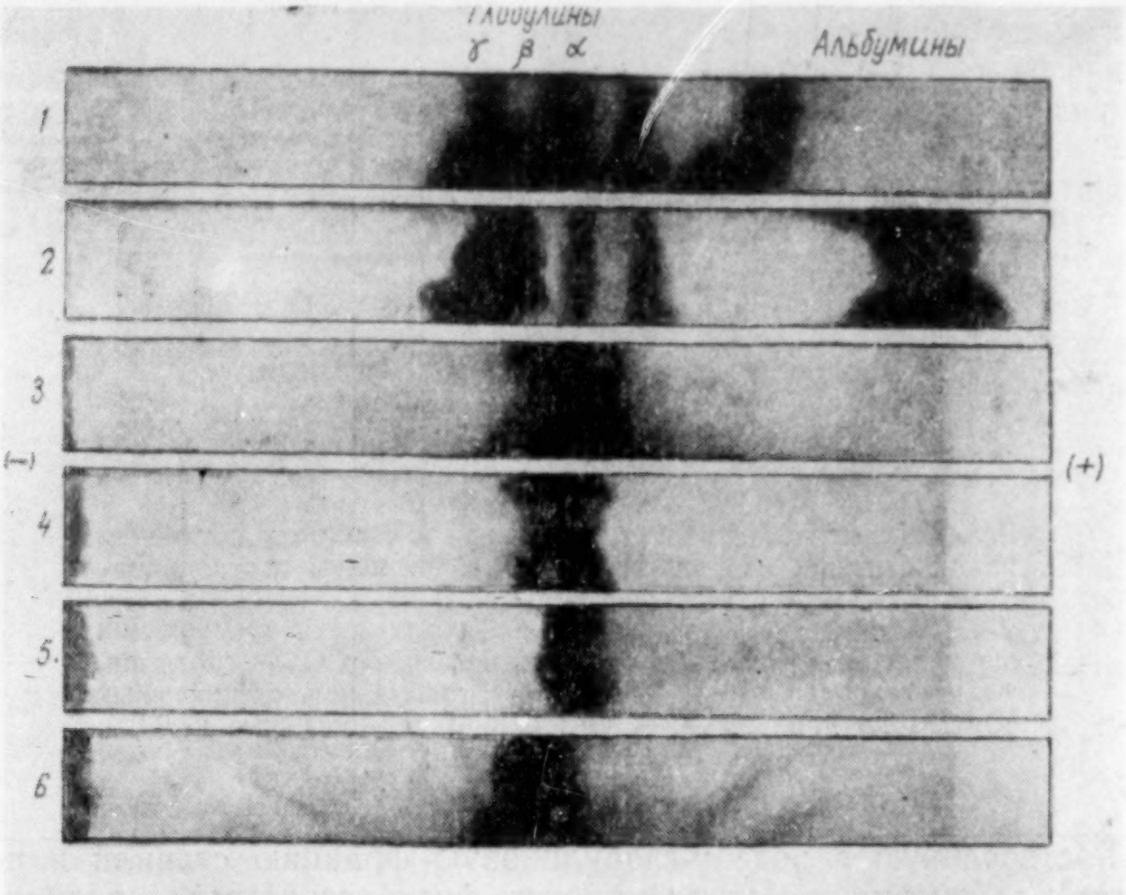


Рис. 3. Электрофореграммы, показывающие чистоту меченных изотиоцианатом флуоресценна γ-глобулинов:
1 — лошадиная нормальная (контрольная); *2* — кроличья нормальная; *3* — конъюгат вируса Х.

Проверка обработанных флуоресцирующим красителем диагностических антивирусных и антибактериальных сывороток заключалась в том, что устанавливали, сохраняются ли их свойства: во-первых, вступать в специфические реакции с гомологичными антигенами возбудителей; во-вторых, выявлять соответствующие антигены из смеси чистых культур различных возбудителей и, в-третьих, выявлять возбудителя непосредственно в пораженных растительных тканях.

Как упомянуто выше, мы использовали прямой метод Кунса и Каплана, т. е. соответствующий антиген обрабатывали непосредственно флуоресцирующей сывороткой, специфичной к данной (искомому) антигену. Иммунологическая реакция между антигеном и меченым антителом осуществлялась при этом на предметном стекле. Методика окраски препаратов состояла в следующем. На предметное стекло наносили изучаемый антиген в виде мазка-отпечатка 15 минут в 96°-ном этиловом спирте и обрабатывали испытуемой люминесцирующей сывороткой (экспозиция обработки — 15 минут). Затем препараты в течение 7 минут промывали в ванночке с проточной водой при температуре 16°, подсушивали на воздухе и заключали под покровное стекло в каплю

глицерина с физиологическим раствором в соотношении 9 : 1. Избыток глицерина удаляли фильтровальной бумагой, после чего препарат просматривали в люминесцентном микроскопе МЛ-2.

Испытание специфичности люминесцирующих сывороток

Эта часть работы состояла в проверке способности меченых антител диагностических сывороток вступать в специфическую реакцию только с гомологичными бактериальными антигенами. В результате опытов, поставленных с культурами E. aroideae и C. sepedonicum по описанной выше методике, было установлено, что меченные изотиоцианатом флуоресцеина иммунные белки антибактериальных сывороток, соединяясь с соответствующими антигенами, дают строго специфическое свечение гомологичных бактериальных клеток (рис. 4) и не дают его в смесях с другими бактериальными антигенами.

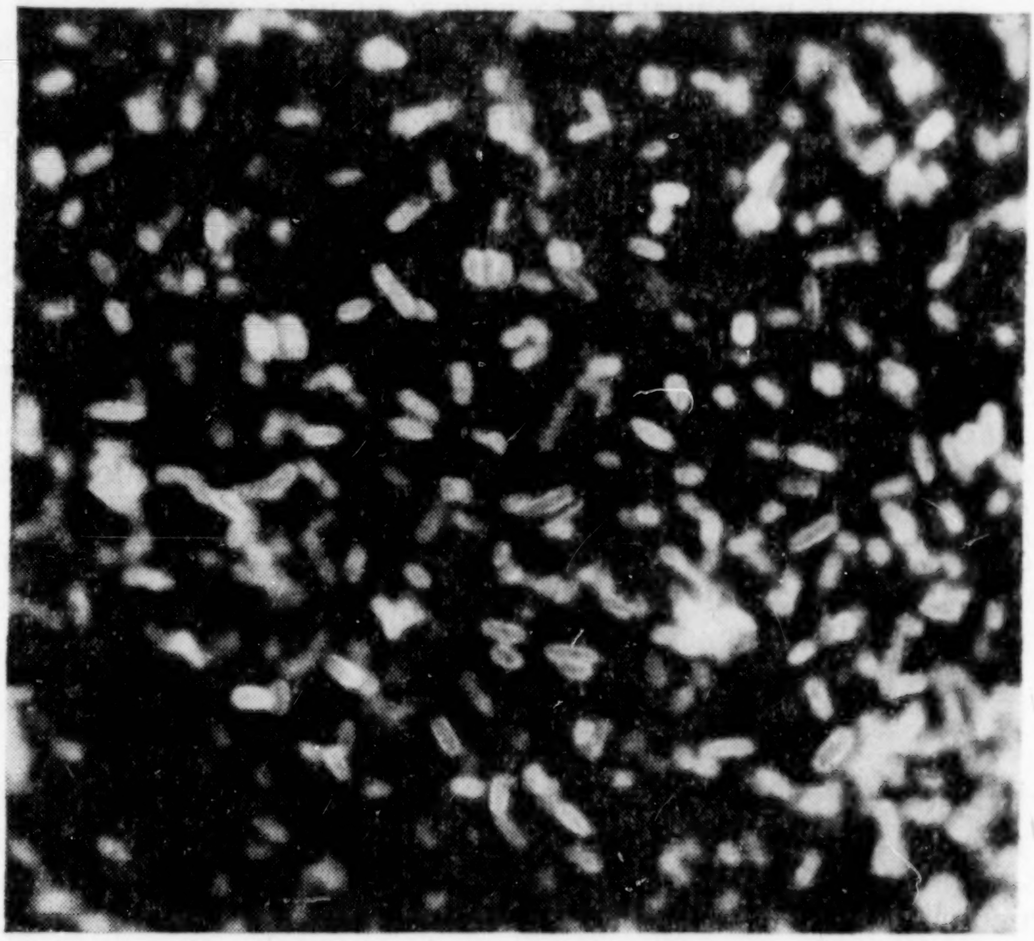


Рис. 4. Свечение бактериальных клеток Erwinia aroideae, обработанных специфичной люминесцирующей сывороткой.

После опытов с чистыми культурами была испытана возможность обнаруживать искомые антигены бактерий соответствующих видов в естественном растительном материале. При этом учитывалось, что в последнем случае возможность неспецифической адсорбции меченых антител гетерологичными антигенами намного больше, чем в работе с чистыми культурами. Первые опыты с естественным растительным материалом (соскоб из ткани клубня картофеля, пораженного кольцевой гнилью) дали обнадеживающие результаты. Наблюдалось хорошо выраженное периферическое свечение бактериальных клеток C. sepedonicum. Характеристика интенсивности специфического свечения бактериальных клеток, обработанных гомологичной люминесцирующей сывороткой, представлена в таблице.

Характеристика интенсивности свечения люминесцирующих диагностических сывороток

Антигены	Разведение специфичных сывороток				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
C. Sepedonicum:					
чистая культура	+++	++	+(+)	+	±
ткань из пораженного клубня картофеля	++	+(+)	+	±	—
E. aroideae (чистая культура)	+++	++(+)	++	±	—

Примечание. Знаками плюс отмечена интенсивность свечения клеток; знаком минус—отсутствие свечения клеток; +(+), ± — переходы интенсивности свечения клеток от максимальной степени к минимальной; ++— ясно видимый, но несколько расплывчатый, слабо светящийся контур бактериальной клетки; +++—четкий, ярко светящийся контур бактериальной клетки.

Диагностические качества люминесцирующих антивирусных сывороток были испытаны на каплях сока из пораженных вирусами X и ВТМ растений, а также на мазках-отпечатках тканей этих растений. При обработке неочищенного сока вирусных растений люминесцирующими сыворотками по описанной выше методике наблюдалось яркое светло-зеленоватое свечение (интенсивность +++) по периферии микрофлокул-преципитации, которые выглядели как темно-зеленая несветящаяся масса с неровными краями.

В случае же мазков-отпечатков, полученных с черешков вирусных листьев, отмечено также периферическое свечение флокул-преципитации, но меньшей интенсивности (+).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Гамма-глобулиновые фракции сывороток, специфичных по отношению к фитопатогенным вирусам Solanum virus 1 — Smith, Nicotiana virus 1 — Smith и бактериям Erwinia aroideae Towns., Corynébacterium sepedonicum (Spick. et Kotth) Scapt et Burkh., меченные изотиоцианатом флуоресцеина, не утрачивают своей специфичности к гомологичным антигенам.

2. Люминесцентно-серологический метод дает возможность применять реакции между антигеном и антителом не только в водных растворах и суспензиях, но и непосредственно в растительных тканях на микроскопических срезах, отпечатках и т. п. для диагностики фитопатогенных вирусов и бактерий и вызываемых ими болезней растений.

3. Использование люминесцентно-серологического метода для выявления фитопатогенных вирусов и бактерий в естественном растительном материале представляет наибольший интерес. Однако при этом необходимо учитывать, что:

а) развитие патологического процесса в растении может быть обусловлено одновременно или последовательно несколькими возбудителями;

б) сопутствующая сапрофитная микрофлора иногда может вызывать явления неспецифической адсорбции меченых антител.

Литература

1. Дунин М. С., Попова Н. Н. Капельный метод анализа вирусов в растениеводстве. Сельхозгиз, 1937.
2. Дунин М. С. В книге «Вирусные болезни и меры борьбы с ними». М., 1941.
3. Камераз А. Я., Щербакова Н. М. Бюллетень Всесоюзного института растениеводства № 4, 1958.
4. Ларина Э. И. Разработка и оценка способов быстрой диагностики вирусных болезней растений (люминесцентный анализ, химический метод). Автореферат кандидатской диссертации. Л., 1963.
5. Левина Е. Н., Кабанова Е. А. Первая Всероссийская конференция эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов. М., 1959.
6. Люминесцирующие антитела в микробиологии. Сборник, Медгиз, М., 1962.
7. Мейсель М. Н. Микробиология, № 16, 1947.
8. Мейсель М. Н., Кабанова Е. А., Левина Е. Н., Пишурина М. М. Люминесцирующие антитела и их применение в цитологии и в микробиологии № 6, 1957.
9. Михайлов И. Ф. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии № 8, 1958.
10. Bercks R. und Zimmer K. Phytopathologische Zeitschrift. Bd. 25, 1956.
11. Coons A. H. et al. Proc. Soc. Exp. Biol., vol. 47, 1941.
12. Coons A. H., Kaplan M. H. Journ. Exp. Med., vol. 91, № 1, 1950.
13. Dounine M. S. Bacterial Diseases of Potatoes. Report of the International Conference on Corynebacterium Sepedonicum and Pseudomonas Solanasearum. (Paris 15—16 november 1960). European and Mediterranean Piant Protection Organisation. Paris, 1961.
14. Nagarai A. N. and Black L. M. Virology, vol. 15, № 3, 1961.
15. Nilsson L. Report of the International Conference on Corynebacterium Sepedonicum and Pseudomonas solanacearum.
16. Slogteren, D. H. M. van: 3 papers in Proc. and Conf. Potato Virus Dis. Wageningen — Lisse 1954 (1955), 35—39, 45—54.
17. Swiezijncki K. Acta. Soc. Bot. Polon, vol. 20, (Referate: Biological Abstracts, 28, 1954).
18. Weller T. H., Coons A. H. Proc. Soc. Exp. Biol., vol. 86, № 4, 1954.

Статья поступила 11 декабря 1963 г.

В литературе есть ука
и мазута под хлопчатник
шает количество углеки
воздуха. По-видимому, кр
жительных сторон примен
отходов, она играет также
вышении углекислотного г
Все это вместе взятое

ABUZARLI, Z.A. & SAFAROV, SH.A. (Azerb. Inst. Pl. Prot.) 1964

Antibiotiki i vilt Khlopchatnika. [Antibiotics and Cotton wilt.]

Khlopkovodstvo, 14 (10): 43, 1964.

Microfilm no. 11433

Марганe

Ш. К. КАДЫРОВ,
Ташкентский текст

Изучение в течение ряда лет влияния микроэлементов на рост, развитие и урожай хлопчатника, проводившееся членом-корреспондентом АН Узбекской ССР Х. У. Усмановым и авторами статьи, убедительно показали, что применение микроэлементов повышает урожайность хлопчатника и улучшает физико-механические свойства хлопкового волокна.

В 1963 г. в колхозе имени Свердлова Янгиюльского производственного управления был произведен посев хлопчатника сорта 108-Ф на площади 8 га, причем перед посевом семена опудривались солями марганца в виде марганцовокислого калия из расчета 150—200 г на 100 кг семян. Полевой опыт проводился в 3-кратной повторности на луговых почвах. Перед уборкой урожая 11 сентября 1963 г. провели дефолиацию хлопчатника путем авиаобработки цианамидом кальция.

Наблюдение за растениями после обработки химическими препаратами показало, что к 24 сентября верхние листья опали и частично сморщились, а ниже расположенные остались зелеными. Вследствие этого в хлопке машинного сбора было обнаружено большое количество зеленых листьев, являющихся источником повышения его влажности

машинный сбор хлопка-сырца проводился серийной хлопкоуборочной машиной ХВС-1,2. Для выяснения влияния светопогоды на свойства хлопкового волокна были приняты следующие варианты сбора урожая: ручной сбор 15—17 сентября (контроль); первый машинный сбор 25 сентября при 50% раскрытия коробочек; второй машинный сбор (4 октября) при дополнительном раскрытии коробочек на 25—30%; сбор всего оставшегося хлопка с 19 по 25 октября.

Первый машинный сбор составил 12,5 т, второй — 7,98 т и курак (по сырцу) — 1,4 т. Всего с 8 га было собрано 21,88 т хлопка, в том числе 57,2% при первом машинном сборе, 36,4% при втором (вместе с подбором) и 6,4% при курачном сборе.

Комплектование партии хлопка ручного сбора закончили 21 сентября. Он имел следующую характеристику: влажность — 6,96% и засоренность — 1,26%. Хлопок первого машинного сбора имел влажность 9,6% и засоренность 10,1%, второго сбора соответственно — 9,4 и 6,26% и курак — 19,4 и 15,3%.

Технологические показатели волокна всех сборов после сушки и джинирования на Янгиюльском хлопкозаводе приведены в таблице.

Качество хлопкового волокна разных видов сбора

Варианты	Коэффициент зрелости	Метрический номер	Разрывная нагрузка (г)	Разрывная длина (км)	Длина волокна (мм)		Сумма пороков и засоренность (%)	Влажность (%)
					модальная	штапельная		
Ручной сбор с полей без опудривания семян . . .	2,0	5500	4,5	25,0	28,5	31,5	5,8	5,8
Ручной сбор с опудриванием семян	2,2	5211	5,0	26,1	28,7	31,9	1,9	5,5
Первый машинный сбор без опудривания семян . .	2,0	5580	4,5	25,1	28,5	31,5	3,8	5,7
Первый машинный сбор с опудриванием семян . . .	2,1	5440	4,7	25,6	29,0	32,1	3,9	4,9
Второй машинный сбор без опудривания семян . .	1,7	6800	3,7	25,0	28,6	31,6	9,2	6,9
Второй машинный сбор с опудриванием семян . . .	1,9	6098	4,1	25,0	28,7	31,9	4,3	5,5
Курачный сбор с опудриванием семян	1,3	10000	2,1	21,0	28,4	31,9	12,4	12,4

Как видно из приведенных в таблице данных, наилучшие технологические показатели получаются при ручном сборе (разрывная нагрузка — 5,0 г, разрывная длина — 26,1 км, метрический номер 5211). Но база волокна (36,4%) менее равномерна по длине по сравнению с базами при машинном сборе хлопка. По величине разрывной нагрузки первый машинный сбор (4,7 г) занимает второе место, второй машинный сбор (4,1 г) — третье и курачный (2,1 г) — четвертое.

Увеличение разрывной нагрузки хлопкового волокна под действием марганца объясняется тем, что последний поступает в хлопковое волокно, где и накапливается в виде солей. Соли марганца обладают свойством люминафора и падающие солнечные ультрафиолетовые лучи отражаются ими больше, поэтому прочность не уменьшается. С другой стороны, марганец может связаться с гидроксильными группами макромолекулы целлюлозы, образуя комплексные соединения. Эта сторона нуждается в дальнейшем доказательстве.

Хотя в литературе и имеются данные о комплексных соединениях целлюлозы с марганцем, использование этих свойств марганца открывает путь к широкому внедрению машинного сбора, так как при его помощи ухудшение качества хлопка-волокна можно намного уменьшить.

Применение соли марганца в хлопководстве будет способствовать повышению урожайности и улучшению качества хлопкового волокна.

АНТИБИОТИКИ И ВИЛТ ХЛОПЧАТНИКА

З. А. АБУЗАРЛИ, Ш. А. САФАРОВ
Азербайджанский научно-исследовательский институт защиты растений

633.51-2.4

В 1961 и 1962 гг. мы испытывали действие антибиотиков на вилт хлопчатника в условиях Азербайджанской ССР.

Исследования, проведенные нами с трихотецином и кандицидином, обладающими антигрибным спектром действия, показали обнадеживающие результаты применения антибиотиков в борьбе с вилтом хлопчатника, и в 1963 г. эта работа была продолжена.

В опыте по предпосевной обработке семян хлопчатника, проводившемся на участке АзНИИЗР в г. Кировабаде, были применены следующие антибиотики: трихотецин, кандицидин и их комбинации с фитобактериомицином и кариоцином (Бх-6, Бх-10, Бх-13 и Бх-14). Фитобактериомицин — антибиотик актиномицетного происхождения, применяется против бактериоза (гоммоза) хлопчатника. Кариоцин, по данным Г. И. Лагазидзе (1948, 1949), является растительным экстрактом, обладающим антибиотическими свойствами по отношению к возбудителю гоммоза хлопчатника.

Антибиотики трихотецин и кандицидин применялись в 0,1%-ной концентрации, кариоцин — в 3%-ной и фитобактериомицин — в 20%-ной. Обработка семян хлопчатника заключалась в обволакивании их водными растворами антибиотиков соответствующей концентрации из расчета 20 л на тонну семян.

Семена сорта 108-Ф перед обработкой были подвергнуты механическому делинтерованию на машине СОМ-3 с последующим сортированием.

Посеяли хлопчатник 5 мая ручным способом по 6 семян в каждую лунку по предпосевному поливу по схеме 60×60 см. В лунке оставляли по три растения. Повторность в опыте 4-кратная, делянка однорядная длиной 16 м.

Задачей опыта было выяснить, происходит ли проникновение антибиотиков в растения при обработке ими семян и в какой мере это может сказываться на их устойчивость к вилту.

Все применявшиеся в опыте антибиотики и их различные комбинации способствовали повышению полевой всхожести семян хлопчатника. Самая высокая полевая всхожесть отмечена у семян, обработанных раствором Бх-13, в составе которого имеются 3%-ный раствор кариоцина и 0,1%-ный раствор кандицидина.

Так, например, по этому препарату полевая всхожесть семян составляла 74,3% против 64,8% в контроле и 72,1% у стандарта (обработка семян ТХФМ из расчета 3 кг на тонну). К нему приближается препарат Бх-10, по которому полевая всхожесть составила 71,6%.

Первые признаки вилта на опытном участке были отмечены 4 июня. Начиная с этого срока проводилось несколько учетов заболевания вилтом по внешним признакам, а в конце вегетации— по внутренним признакам.

Оценивая полученные результаты, следует отметить, что упомянутые антибиотики и их различные комбинации дают определенный эффект в борьбе с вилтом хлопчатника. Наибольшая урожайность по сравнению с другими вариантами, с контролем и со стандартом наблюдается в случае, когда семена обрабатываются раствором Бх-10, в составе которого имеются растворы трех антибиотиков—трихотецина, кариоцина и фитобактериомицина. Урожай хлопка в этом варианте превышал урожай контроля на 22%. Такое же положительное действие на урожайность хлопчатника оказывают обработки семян 3%-ным кариоцином (18,6%) и раствором Бх-13 (15,2%), в состав которого, кроме кандицидина, входит и кариоцин.

Материалы опыта свидетельствуют о перспективности применения предпосевной обработки семян антибиотиками в деле повышения сопротивляемости хлопчатника вилту.

степени со скороспелостью сорта. Так, более поздние сорта обладают резко выраженным периодом послеуборочного дозревания и наибольшим количеством водорастворимых фенольных веществ. Наоборот, скороспелые сорта, у которых менее резко выражено послеуборочное дозревание, меньше содержат в семенной оболочке подвижных фенольных веществ.

Межвидовые и межсортовые различия в содержании водорастворимых фенолов еще раз говорят о том, что эти вещества играют важную роль как ингибиторы прорастания свежеубранных семян.

Наконец, нами была поставлена серия опытов, иллюстрирующих влияние фенольных веществ оболочки на прорастание зародыша. Семена проращивались на фенольных вытяжках, полученных путем экстракции мелко размолотой оболочки теплой водой.

В некоторых опытах для более полной и быстрой экстракции мы применяли смесь ацетона с водой в соотношении 3 : 2. Из вытяжки ацетон отгоняли и остаток разбавляли водой. Наличие фенольных веществ в ней определяли с помощью различных реактивов, в том числе 1%-ного раствора ванилина в концентрированной соляной кислоте.

В вытяжках замачивались семена, с которых предварительно была удалена оболочка. Набухшие семена проращивались в термостате при 28—30° на фильтровальной бумаге, смоченной теми же экстрактами.

Результаты опытов показывают, что вытяжки из оболочки недозрелых семян, взятых из 50- и 55-дневных коробочек, резко задерживают рост зародыша. Длина корешка в этих вариантах не превышала 0,6 см на вторые сутки, тогда как в контроле она была 4—8 см. Вариант с проращиванием зародышей на вытяжках из оболочки зрелых хранившихся семян не отличался от контроля.

Таким образом, наши наблюдения показывают, что в оболочке недозрелых семян хлопчатника содержатся водорастворимые фенольные вещества, которые задерживают рост зародыша. В оболочке зрелых семян, приобретающей темно-коричневую окраску, ингибирующее действие этих веществ устраняется вследствие превращения их в нерастворимые в воде конденсированные продукты.

В результате накопления нерастворимых в воде продуктов фенольной природы (дубильных веществ, флобафенов, лигнина) снижается гидрофильность оболочки, что в свою очередь способствует улучшению газообмена прорастающего зародыша. Так как полифенолы, содержащиеся в оболочке свежеубранных хлопковых семян, термолабильны, то прогревание семян при температуре 30—40°С в течение 3—5 дней уменьшает содержание их в оболочке и резко повышает всхожесть и энергию прорастания.

ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГРИБА ВЕРТИЦИЛЛИУМ

А. И. СОЛОВЬЕВА
Кандидат сельскохозяйственных наук

А. П. МУХАМЕДОВА
Аспирантка

633.51-2.4

ПОТЕРЮ устойчивости промышленного сорта хлопчатника 108-Ф к вертициллиозному вилту в основном объясняют образованием более агрессивных популяций гриба. Однако в литературе пока отсутствуют работы, которые бы непосредственно указывали на пути возникновения более вирулентных штаммов этого возбудителя.

В наших исследованиях была поставлена цель в какой-то мере восполнить существующий пробел.

Прежде всего следует отметить, что возбудитель вилта обладает значительной морфологической изменчивостью. Например, в зависимости от экологических условий покоящуюся стадию проходят в одном случае псевдосклероции, в другом — цепочки хламидоспор. Подобное явление привело некоторых исследователей к ошибочным выводам (Е. З. Окнина, 1937) о существовании якобы двух видов возбудителя увядания хлопчатника Verticillium dahliae Kleb и Verticillium albo—atrum R and B.

Последующей работой А. И. Соловьева опровергла эту точку зрения и снова доказала, что в условиях нашей страны существует один вид возбудителя увядания хлопчатника Verticillium dahliae Kleb. Высказанное мнение подтверждается тем, что штаммы гриба, образующие псевдосклероции и хламидоспоры, обратимы один в другой.

Следовательно, возбудитель мог изменяться не только физиологически, но и морфологически. С этой точки зрения весьма интересным является состав форм Verticillium dahliae, вновь просмотренный нами в 1963 г. В результате наших наблюдений за развитием гриба в чистой культуре получены данные, которые в какой-то мере вскрывают процесс его изменчивости.

В Советском Союзе в начале 30-х годов на ранних этапах работы с возбудителем вилта было установлено, что выделяемый из растений Verticillium dahliae, как правило, образует на картофельном агаре черные концентрированные круги, состоящие из псевдосклероциев (рис. 1), а на сладком картофельном агаре — черную карбонизированную пленку. Подобная картина наблюдалась в течение многих лет независимо от того, из какого района возделывания хлоп-

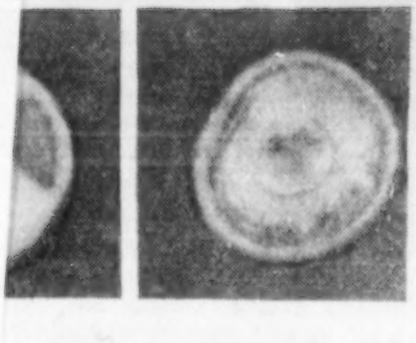
Рис. 1. Характерный рост гриба на картофельном агаре.

SOLOV'EVA, A.I. (Mme) & MUKHAMEDOVA, A.P. (Mme.) 1964

Ob izmenchivosti griba Verticillium. [On the saltation of the Verticillium fungus.]

Khlopkovodstvo, 14 (10): 50-52, 3 fig., 1964.

MICROFILM NO. 11435



...ice.

сорта хлопчатника и ... бился к ним, из больных растений стали выделять самые различные формы гриба. Так, осенью 1962 г. из 98 пораженных вилтом стеблей хлопчатника, собранных в колхозе «Коммунизм» Янгиюльского производственного управления, получили 51 штамм гриба с типичным ростом и 42 штамма с отклонениями. Последние проявлялись в том, что наряду с колониями, образующими черные концентрические круги, наблюдались совершенно белые. Можно встретить также черные колонии, в которые вклинивается в виде секторов мицелий, не образующий псевдосклероциев, и наоборот. Причем форма и размер этих секторов сильно варьировала, что видно на рисунке 2.

В процессе наблюдений за выделенными культурами гриба, естественно, встал вопрос о природе возникновения такого разнообразия форм в пределах одного и того же вида. Представилось интересным изучить процесс формообразования у Verticillium dahliae с момента прорастания псевдосклероциев. Для этих целей нами проращивались псевдосклероции на агаровых пластинках с биомицином, на которых бактерии не развиваются. Такой метод обеспечил совершенно четкую видимость проростков псевдосклероциев и дальнейшего развития мицелия.

Полученные данные позволяют предположить, что морфологические отклонения формы гриба, по-видимому, образуются путем вегетативной гибридизации. Это явление наиболее вероятно для Verticillium dahliae Kleb, относящегося к группе несовершенных грибов.

В 1933 г. А. А. Ячевский отметил явление, напоминающее вегетативную гибридизацию: «Срастание может происходить между ветвями одной и той же грибницы, пребывающими на некотором расстоянии и тем не менее оказывающими друг на друга известное притягательное влияние, в силу которого каждая из них выпускает навстречу боковую ветку. В месте встречи этих веток происходит срастание, которое носит название анастамозы». Аналогичное определение мы находим и у Л. И. Курсанова (1933), по мнению которого через анастамозы перемещается клеточное ядро из одной клетки в другую и осуществляется переход от галлоидного к диплоидному мицелию.

И. В. Сутокская в обзорной статье о сексуализации грибов приводит данные Banerjee и Samadder, которые у гименомицета Daedaleae flavida наблюдали в многоспоровых культурах обилие смычек или спаек (clamp—connexion) между гифами. Это счи... ...гетероталии, так как последние ...е моноспоровой культуры. ...указывая на смычки и спайки, ...анастамоз. Тем не менее в ...чень напоминают его, в чем уеждае... Л. И. Курсанов указывает на анастомозы как характерное явление для гименомицетов.

В результате микроскопирования прорастающих псевдосклероциев нам удалось без особых затруднений обнаружить анастамоз отдельных гиф гриба (рис. 3).

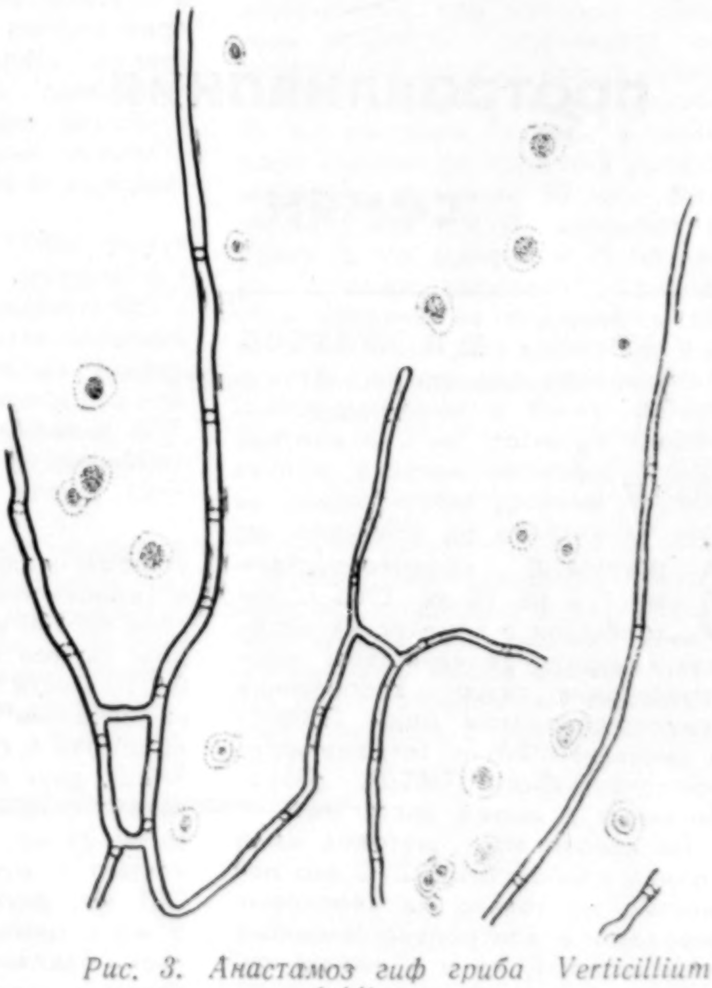


Рис. 3. Анастамоз гиф гриба Verticillium dahliae.

Анастамоз гиф, разноименных по наследственным признакам, может приводить к вегетативной гибридизации. Этим в значительной мере и объясняется все разнообразие форм, выделенных из больных растений и описанных в литературе А. И. Соловьевой, Т. С. Панфиловой, С. С. Рамазановой и другими.

На основании полученного нами материала многообразие форм, наблюдаемое при росте гриба на картофельном агаре, можно, по-видимому, объяснить

степени со скороспелостью сорта. Так, более поздние сорта обладают резко выраженным периодом послеуборочного дозревания и наибольшим количеством водорастворимых фенольных веществ. Наоборот, скороспелые сорта, у которых менее резко выражено послеуборочное дозревание, меньше содержат в семенной оболочке подвижных фенольных веществ.

Межвидовые и межсортовые различия в содержании водорастворимых фенолов еще раз говорят о том, что эти вещества играют важную роль как ингибиторы прорастания свежеубранных семян.

Наконец, нами была поставлена серия опытов, иллюстрирующих влияние фенольных веществ оболочки на прорастание зародыша. Семена проращивались на фенольных вытяжках, полученных путем экстракции мелко размолотой оболочки теплой водой.

В некоторых опытах для более полной и быстрой экстракции мы применяли смесь ацетона с водой в соотношении 3 : 2. Из вытяжки ацетон отгоняли и остаток разбавляли водой. Наличие фенольных веществ в ней определяли с помощью различных реактивов, в том числе 1%-ного раствора ванилина в концентрированной соляной кислоте.

В вытяжках замачивались семена, с которых предварительно была удалена оболочка. Набухшие семена проращивались в термостате при 28—30° на фильтровальной бумаге, смоченной теми же экстрактами.

Результаты опытов показывают, что вытяжки из оболочки недозрелых семян, взятых из 50- и 55-дневных коробочек, резко задерживают рост зародыша. Длина корешка в этих вариантах не превышала 0,6 см на вторые сутки, тогда как в контроле она была 4—8 см. Вариант с проращиванием зародышей на вытяжках из оболочки зрелых хранившихся семян не отличался от контроля.

Таким образом, наши наблюдения показывают, что в оболочке недозрелых семян хлопчатника содержатся водорастворимые фенольные вещества, которые задерживают рост зародыша. В оболочке зрелых семян, приобретающей темно-коричневую окраску, ингибирующее действие этих веществ устраняется вследствие превращения их в нерастворимые в воде конденсированные продукты.

В результате накопления нерастворимых в воде продуктов фенольной природы (дубильных веществ, флобафенов, лигнина) снижается гидрофильность оболочки, что в свою очередь способствует улучшению газообмена прорастающего зародыша. Так как полифенолы, содержащиеся в оболочке свежеубранных хлопковых семян, термолабильны, то прогревание семян при температуре 30—40°C в течение 3—5 дней уменьшает содержание их в оболочке и резко повышает всхожесть и энергию прорастания.

ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГРИБА ВЕРТИЦИЛЛИУМ

А. И. СОЛОВЬЕВА
Кандидат сельскохозяйственных наук
А. П. МУХАМЕДОВА
Аспирантка

633.51-2.4

ПОТЕРЮ устойчивости промышленного сорта хлопчатника 108-Ф к вертициллиозному вилту в основном объясняют образованием более агрессивных популяций гриба. Однако в литературе пока отсутствуют работы, которые бы непосредственно указывали на пути возникновения более вирулентных штаммов этого возбудителя.

В наших исследованиях была поставлена цель в какой-то мере восполнить существующий пробел.

Прежде всего следует отметить, что возбудитель вилта обладает значительной морфологической изменчивостью. Например, в зависимости от экологических условий покоящуюся стадию проходят в одном случае псевдосклероции, в другом — цепочки хламидоспор. Подобное явление привело некоторых исследователей к ошибочным выводам (Е. З. Окнина, 1937) о существовании якобы двух видов возбудителя увядания хлопчатника Verticillium dahliae Kleb и Verticillium albo—atrum R and B.

Последующей работой А. И. Соловьева опровергла эту точку зрения и снова доказала, что в условиях нашей страны существует один вид возбудителя увядания хлопчатника Verticillium dahliae Kleb. Высказанное мнение подтверждается тем, что штаммы гриба, образующие псевдосклероции и хламидоспоры, обратимы один в другой.

Следовательно, возбудитель мог изменяться не только физиологически, но и морфологически. С этой точки зрения весьма интересным является состав форм Verticillium dahliae, вновь просмотренный нами в 1963 г. В результате наших наблюдений за развитием гриба в чистой культуре получены данные, которые в какой-то мере вскрывают процесс его изменчивости.

В Советском Союзе в начале 30-х годов на ранних этапах работы с возбудителем вилта было установлено, что выделяемый из растений Verticillium dahliae, как правило, образует на картофельном агаре черные концентрированные круги, состоящие из псевдосклероциев (рис. 1), а на сладком картофельном агаре — черную карбонизированную пленку. Подобная картина наблюдалась в течение многих лет независимо от того, из какого района возделывания хлоп-

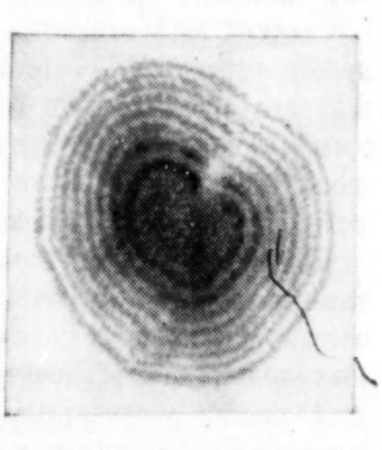


Рис. 1. Характерный рост гриба на картофельном агаре.

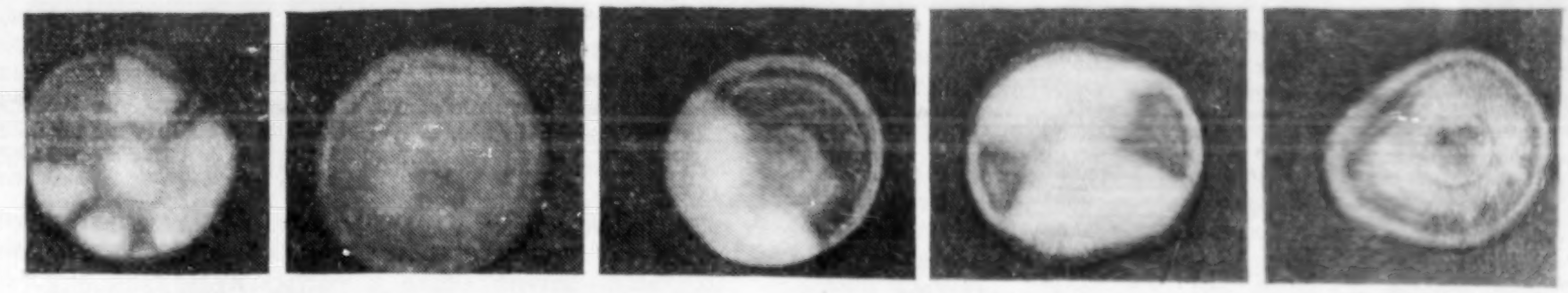


Рис. 2. Форма и размер секторов у Verticillium dahliae.

чатника был получен материал (А. И. Соловьева, 1938). Другой характер роста исследователями отмечался чрезвычайно редко.

Когда же внедрили в производство устойчивые сорта хлопчатника и возбудитель вилта приспособился к ним, из больных растений стали выделять самые различные формы гриба. Так, осенью 1962 г. из 98 пораженных вилтом стеблей хлопчатника, собранных в колхозе «Коммунизм» Янгиюльского производственного управления, получили 51 штамм гриба с типичным ростом и 42 штамма с отклонениями. Последние проявлялись в том, что наряду с колониями, образующими черные концентрические круги, наблюдались совершенно белые. Можно встретить также черные колонии, в которые вклинивается в виде секторов мицелий, не образующий псевдосклероциев, и наоборот. Причем форма и размер этих секторов сильно варьировала, что видно на рисунке 2.

В процессе наблюдений за выделенными культурами гриба, естественно, встал вопрос о природе возникновения такого разнообразия форм в пределах одного и того же вида. Представилось интересным изучить процесс формообразования у Verticillium dahliae с момента прорастания псевдосклероциев. Для этих целей нами проращивались псевдосклероции на агаровых пластинках с биомицином, на которых бактерии не развиваются. Такой метод обеспечил совершенно четкую видимость проростков псевдосклероциев и дальнейшего развития мицелия.

Полученные данные позволяют предположить, что морфологические отклонения формы гриба, по-видимому, образуются путем вегетативной гибридизации. Это явление наиболее вероятно для Verticillium dahliae Kleb, относящегося к группе несовершенных грибов.

В 1933 г. А. А. Ячевский отметил явление, напоминающее вегетативную гибридизацию: «Срастание может происходить между ветвями одной и той же грибницы, пребывающими на некотором расстоянии и тем не менее оказывающими друг на друга известное притягательное влияние, в силу которого каждая из них выпускает навстречу боковую ветку. В месте встречи этих веток происходит срастание, которое носит название анастамозы». Аналогичное определение мы находим и у Л. И. Курсанова (1933), по мнению которого через анастамозы перемещается клеточное ядро из одной клетки в другую и осуществляется переход от галлоидного к диплоидному мицелию.

И. В. Сутокская в обзорной статье о сексуализации грибов приводит данные Banerjee и Samadder, которые у гименомицета Daedaleae flavida наблюдали в многоспоровых культурах обилие смычек или спаек (clamp—connexion) между гифами. Это считается признаком гетероталии, так как последние отсутствовали в случае моноспоровой культуры. Banerjee и Samadder, указывая на смычки и спайки, не применяли термина анастамоз. Тем не менее в данном случае они очень напоминают его, в чем убеждает нас то, что Л. И. Курсанов указывает на анастомозы как характерное явление для гименомицетов.

В результате микроскопирования прорастающих псевдосклероциев нам удалось без особых затруднений обнаружить анастамоз отдельных гиф гриба (рис. 3).

Рис. 3. Анастамоз гиф гриба Verticillium dahliae.

Анастамоз гиф, разноименных по наследственным признакам, может приводить к вегетативной гибридизации. Этим в значительной мере и объясняется все разнообразие форм, выделенных из больных растений и описанных в литературе А. И. Соловьевой, Т. С. Панфиловой, С. С. Рамазановой и другими.

На основании полученного нами материала многообразие форм, наблюдаемое при росте гриба на картофельном агаре, можно, по-видимому, объяснить

мутацией, представляющей собой резкое уклонение или новообразование признаков под влиянием изменения условий жизни или воздействия сильнодействующих факторов. В первую очередь таким фактором, который привел к сильному изменению условий жизни гриба Verticillium dahliae, явился устойчивый сорт хлопчатника, введенный в производство.

Однако следует оговориться, что для возникновения мутаций у микроорганизмов более благоприятными условиями, чем в природе, являются питательные среды, на которых мицелиальная масса достигает большего развития. Поэтому при получении форм гриба Verticillium dahliae необходимо пользоваться только свежевыделенными штаммами, не подвергавшимися пассажированию на искусственных средах. В противном случае исследователь может выявить значительное количество их, что не будет отображать фактического состава форм гриба в природе.

В заключение отметим, что наблюдаемый нами различный характер роста у свежевыделенных штаммов возбудителя вилта в чистых культурах и установление анастамоза в значительной мере объясняют процесс формообразования у гриба Verticillium dahliae Kleb, происходящего в природе.

Прибор для определения качества протравливания семян

А. И. КУЛИКОВ
Всесоюзный институт защиты растений

631.531.17

Прибор для определения качества протравливания семян.

В ЖУРНАЛЕ «Хлопководство» № 7 и № 10 за 1963 г. мы сообщали о химических методах контроля за качеством протравливания семян хлопчатника трихлорфенолятом меди (ТХФМ) и смесью ТХФМ и тетраметилтиурамдисульфида (ТМТД), разработанных в нашем институте.

На основе этих методов нами создан прибор ВИЗР-2. С его помощью не только на хлопковых заводах и в контрольно-семенных лабораториях, но и в любом хозяйстве можно быстро и надежно определить качество протравливания семян хлопчатника указанными препаратами.

Прибор представляет собой комплект реактивов, посуды и принадлежностей для колориметрического определения ТХФМ и смеси ТХФМ и ТМТД. Вид прибора и его содержимое представлены на рисунке.

Прибор состоит из трех банок **1** емкостью 100 мл, склянок с раствором желтой кровяной соли **2** и сернокислого аммония **3** емкостью по 100 мл, склянки с раствором серной кислоты **4** емкостью 0,5 л, шести пробирок **5** с полиэтиленовыми пробками, двух пробирок **6** с сухим реактивом на ТМТД, двух пробирок **7** с гидрохиноном, измерительного цилиндра на 25 мл, четырех пипеток емкостью 1 мл с ценой деления 0,01 мл, двух пипеток емкостью 5 мл с ценой деления 0,05 мл, трех стеклянных воронок, трех часовых стекол, стеклянной палочки с пуговкой, трех пачек фильтровальной бумаги и вынимающегося из чемоданчика штатива **8** с набором из шестнадцати ампул со стандартными растворами на ТХФМ.

Оттенок и интенсивность окраски стандартных растворов на ТХФМ соответствуют окраске раствора, получаемого из количества ТХФМ, указанного на ампуле. В набор стандартов входят две серии по восемь растворов в каждой с метками ДС и ЭС, соответствующих содержанию ТХФМ: 0,3; 0,6; 0,8; 1,1; 1,4; 1,7; 2,0; 2,2 мг. Растворы с меткой ДС используются для сравнения с пробой при днезном свете, а с меткой ЭС — при электрическом.

К прибору прилагаются также две коробки по 8 ампул стандартных растворов на комбинированный протравитель (ТХФМ и ТМТД) с метками ДС и ЭС. Оттенок и интенсивность их окраски соответствуют окраске раствора, получаемого из соответствующих количеств ТМТД или ТХФМ, указанных на этикетках ампул.

В приборе имеются три пакетика с сернокислым аммонием и ершик для мытья посуды. Все это размещено в специальном чемоданчике, имеющем гнезда и держатели. На внутренней стороне крышки чемодана наклеен пенопласт для надежной фиксации со-

держимого прибора на своих местах после закрытия крышки.

К каждому прибору прилагается инструкция с подробным описанием хода определения, проводимых при этом расчетов, приготовления растворов и т. д.

Анализ ведется в зависимости от протравителя.

При обработке семян только трихлорфенолятом меди определение качества протравливания проводится следующим образом. На технических весах отвешивают навеску 50 г делинтерованных или 25 г опушенных семян и помещают их в банку, в которую предварительно заливают соответственно 50 или 25 мл 0,2%-ного раствора серной кислоты. Опушенные семена помещают в банку с кислотой небольшими порциями, утрамбовывая их стеклянной палочкой с пуговкой. Банку закрывают крышкой и встряхивают 50 раз. Часть раствора фильтруют в пробирку. Когда отфильтруется 3—5 мл раствора, из него пипеткой берут для анализа в пробирку 1 мл и добавляют 3,4 мл воды и 0,5 мл 20%-ного раствора сернокислого аммония. Затем добавляют 0,1 мл 3%-ного раствора желтой кровяной соли. Пробирку с пробой встряхивают и окрашенный раствор сравнивают с окраской стандартных растворов, подбирая расцветку, наиболе близкую к пробе. Указанная на пробирке стандартного раствора цифра и определяет содержание ТХФМ в пробе в миллиграммах.

Для удобства на пробирке со стандартными растворами, кроме содержания ТХФМ (мг), дается соответствующее данной пробе содержание 20%-ного дуста ТХФМ в кг на 1 т семян и процент полноты протравливания для опушенных семян (7 кг/т), а для делинтерованных (норма 6 кг/т). Этот показатель можно найти по таблице, которая дается в инструкции к прибору.

Контроль за качеством протравливания семян комбинированным препаратом, содержащим одновременно и ТХФМ и ТМТД, осуществляется путем определения каждого протравителя в отдельности.

Для определения ТМТД на технических весах берут навеску 25 г семян, которую помещают в банку, заливают 25 мл ацетона и 25 мл воды и встряхивают 30 раз. В пробирку отбирают пипеткой 0,1 мл пробы и добавляют 4,9 мл ацетона, а затем 0,9—1,0 мл реактива на ТМТД. Пробирку закрывают пробкой, и через 10—15 мин сравнивают окраску пробы со стандартными растворами. Если пробирку с пробой нагреть в теплой (35—40°) воде, то сравнивать окраску можно сразу же после подогрева.

Для определения содержания ТМТД в пробе выбирают стандартный раствор на ТМТД, наиболее близкий по цвету к пробе. Указанная на ампуле цифра и будет определять содержание (мг) ТМТД в пробе, по которому производят расчет в граммах на килограмм семян, а затем и расчет полноты протравливания.

Для определения ТХФМ берут навеску в 10 г семян, которую помещают в банку и заливают 48 мл ацетона. Туда же вносят пипеткой 2 мл 7,5%-ного раствора гидрохинона (в смеси ацетона и 2%-ной серной кислоты в отношении 1:1). Банку закрывают, встряхивают 30 раз и оставляют стоять 15—20 минут.

Часть ацетонового раствора фильтруют, затем в пробирку пипеткой отбирают 2,5 мл фильтрата, добавляют 3,4 мл ацетона, встряхивают и сравнивают окраску пробы со стандартным раствором, как это указывалось выше по определению ТМТД.

Весы не входят в комплект прибора и в полевых условиях можно брать пробу семян по объему. Нами было установлено, что 50 г делинтерованных семян хлопчатника имеют объем 45—50 мл, а опушенных — 50—55 мл. Если пренебречь погрешностью на содержание воздуха между семенами (до 10%), то можно принять для обоих видов семян, что 1 г имеет объем 1 мл.

Для определения качества протравливания семян в этом случае навеску берут следующим образом. Предварительно в банку наливают 50, 60, 75 и 100 мл воды и соответственно отмечают ее уровни. После этого мы легко можем с достаточной точностью взять необходимые для анализа количества семян. Чтобы взять 50 г семян без весов для определения ТХФМ, в банку с отмеченным уровнем 100 мл заливают мерным цилиндром 50 мл раствора серной кислоты и добавляют такое количество семян хлопчатника, при котором уровень жидкости поднимется до отметки 100 мл. Для взятия навески в 25 г семян в банку наливают 25 мл раствора кислоты и засыпают семена до поднятия уровня жидкости до метки 50 мл. Для определения ТМТД наливают в банку 25 мл ацетона и 25 мл воды, а затем засыпают семена, пока уровень не поднимется до отметки 75 мл. Для взятия без весов 10 г семян для определения ТХФМ наливают в банку 48 мл ацетона и 2 мл раствора гидрохинона, а затем засыпают столько семян, чтобы уровень жидкости поднялся до отметки 60 мл.

Ацетон не входит в состав реактивов прибора и его приобретают отдельно. Причем можно использовать любой ацетон, который без протравленных семян не дает окраски с реактивом на ТМТД.

На очистке курачевого хлопка агрегатом УПХ-1,5.

Фото А. Алехина